

Title	Biochemical studies and applications of sugar and polyamine metabolisms in gut microbes(Abstract_要旨)
Author(s)	Sugiyama, Yuta
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2020-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.r13344
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	杉山友太
論文題目	Biochemical studies and applications of sugar and polyamine metabolisms in gut microbes (腸内細菌の糖質代謝ならびにポリアミン代謝に関する生化学的研究と応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>腸内細菌は宿主の健康・疾患に影響することから、腸内細菌と宿主の相互作用の理解は宿主の健康を維持するために極めて重要である。しかし、腸内細菌と宿主の相互作用には不明な点が多く残されている。本論文は、腸内細菌と宿主の相互作用を物質の観点から理解するための基盤構築を行ったものである。具体的には、宿主由来因子として糖鎖構造の一つであるH抗原構造に注目し、H抗原構造の効率的な酵素合成法を確立した。一方で、腸内細菌由来因子として、ポリアミンに注目し、ヒト腸内常在細菌におけるポリアミン合成能と輸送能を解析すると共に、その解析結果とゲノム情報を用いた<i>in silico</i>解析を組み合わせることで、新規のポリアミン合成タンパク質および輸送タンパク質の存在予測を行った。さらに、ポリアミンの一種であるプトレッシンの輸送に関して、モデル腸内細菌である大腸菌において中性の生育環境下で機能するエキスポーターの解析を行った。</p> <p>第一章では、宿主と腸内細菌の相互作用を担う宿主由来因子の一つであるH抗原構造の酵素合成法の確立に取り組んだ。</p> <p>H抗原構造はヒトが分泌・発現する糖タンパク質糖鎖や母乳オリゴ糖の非還元末端で見られる二糖構造であり、ビフィズス菌の腸管定着の促進や病原菌の感染阻害に寄与することが報告されており、健康維持に資する宿主と腸内細菌の共生関係の確立に重要な宿主由来因子の一つである。しかし、化学合成法ではH抗原構造の立体および位置選択的な合成は困難である。そこで、立体および位置選択的なH抗原構造の酵素合成法の開発を行った。H抗原構造に特異的に作用する<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM1254由来1,2-α-L-fucosidase (<i>BbAfcA</i>) の触媒残基に対してアミノ酸置換を導入することで、フッ化糖であるβ-フコシルフルオリドを糖供与体として、H抗原構造を立体および位置選択的に導入可能な高機能1,2-α-L-fucosynthase (<i>BbAfcA</i>^{N423H}) を創製した。さらに、<i>BbAfcA</i>^{N423H}が糖受容体として認識する糖構造の特徴を明らかにした。<i>BbAfcA</i>^{N423H}はオリゴ糖のみならず、複合糖質糖鎖（糖タンパク質糖鎖、ならびに、糖脂質）に対してもH抗原構造を立体および位置選択的に導入可能であることを示した。以上の結果より、H抗原構造を介した腸管イベントを理解するためのツールを提供する基盤を構築した。</p> <p>第二章では、ヒト腸内常在細菌のポリアミン合成能および輸送能の解析に取り組んだ。</p> <p>ポリアミンは、細胞増殖や遺伝子発現に寄与する重要な化合物群の一つである。腸管内腔のポリアミンは宿主の健康状態に影響することから、宿主の健康を考える上で腸管内腔ポリアミン濃度の制御は重要である。また、腸管内腔のポリアミンは腸内細菌由来であるため、そのためには、腸内細菌のポリアミン合成、ならびに、輸送の理解が必要であるが、ほとんど解明されていない。そこで、ヒト腸内常在菌叢優勢種のポリアミン合成能および輸送能の解析を行った。また、モデル腸内細菌である大腸菌において、大腸腸管内腔と同じ中性の生育環境下で機能するプトレッシンエキスポーターの解析を行った。</p> <p>Gifu anaerobic mediumで培養可能なヒト腸内常在菌叢優勢種32種およびヒト由来<i>Bifidobacterium</i>属細菌13種を対象として、各菌の細胞内および培養上清中のポリア</p>			

ミン濃度の定量および比較結果に基づき、ポリアミン合成能ならびに輸送能を解析した。さらに、ポリアミン合成能および輸送能の解析結果と既知のポリアミン合成および輸送に関わるタンパク質の有無を照合することで、新規なポリアミン合成タンパク質ならびに輸送タンパク質の存在予測を行った。その結果、ヒト腸内常在菌叢優勢種の11種およびヒト由来 *Bifidobacterium* 属細菌の11種が新規なポリアミン合成タンパク質あるいは輸送タンパク質を有している可能性を見いだした。

大腸菌の網羅的遺伝子破壊ライブラリーのうち、物質輸送に関与することが報告あるいは予想されている遺伝子の破壊株123株を対象に、中性の生育環境下で機能するプトレッシンエキスポーターのスクリーニングを行った。その結果、*sapBCDF*がプトレッシンエキスポーターをコードしている可能性を見だし、*sapBCDF*欠損株および相補株を用いた培養試験により、*sapBCDF*が培養上清中のプトレッシン濃度に影響することを認めた。さらに、大腸菌細胞内に取り込まれた安定同位体標識アルギニンが代謝され生成した安定同位体標識プトレッシンの培養上清中における濃度を定量した結果、OD₆₀₀あたりの培養上清中の安定同位体標識プトレッシン濃度が*sapBCDF*の有無に依存することを見だし、*SapBCDF*が中性の生育環境下での細胞内から細胞外へのプトレッシン排出に寄与するタンパク質の一つであることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

腸内細菌と宿主は相互作用し、この相互作用が宿主の健康に影響することが示されている。腸内細菌と宿主の相互作用を明らかにすることは、健康維持に資する宿主と腸内細菌の共生関係の構築、ひいては、宿主の健康維持に繋がる。しかし、腸内細菌と宿主の相互作用解明は未だ不十分である。本論文は、宿主由来因子としてH抗原構造、腸内細菌由来因子としてポリアミンを取り上げ、腸内細菌と宿主の相互作用を物質の観点から理解するためのツールの提供、ならびに、情報基盤の構築を試みたものである。評価すべき点として、以下の5点が挙げられる。

1. *Bifidobacterium bifidum* JCM1254由来の1,2- α -L-fucosidase (*BbAfcA*) を改変し、高機能1,2- α -L-fucosynthase (*BbAfcA*^{N423H}) を創製し、フッ化糖である β -フコシルフルオリド (β -FucF) を糖供与体とした、H抗原構造の立体および位置選択的な酵素合成法を開発した。
2. *BbAfcA*^{N423H}と β -FucFを用いて、糖タンパク質のO-型糖鎖およびN-型糖鎖、糖脂質に対してもH抗原構造を導入できることを示し、*BbAfcA*^{N423H}のH抗原構造含有糖鎖合成ツールとしての有用性を示した。
3. ヒト腸内常在菌叢優勢種のポリアミン合成能と輸送能を解析し、さらに、*in silico*解析を組み合わせることで、ヒト腸内常在菌叢優勢種が新規なポリアミン合成タンパク質および輸送タンパク質を有する可能性を示した。
4. ヒト由来*Bifidobacterium*属細菌のポリアミン合成能と輸送能を解析すると共に、*in silico*解析を組み合わせることで、ヒト由来*Bifidobacterium*属細菌が新規なポリアミン合成タンパク質および輸送タンパク質を有する可能性を示した。
5. 大腸菌においてSapBCDFが中性の生育環境下でのプトレッシン排出に寄与するタンパク質の一つであることを示した。

以上のように、本論文は、腸内細菌と宿主の相互作用を物質の観点から理解すべく、宿主由来因子の一つであるH抗原構造含有糖鎖の酵素合成法を開発した。加えて、ヒト腸内常在菌のポリアミン合成能と輸送能の解析、ならびに、腸内細菌の一種である大腸菌が有するプトレッシン排出に寄与する新規タンパク質の同定を通じて、腸管内腔のポリアミン濃度制御に向けた情報を収集したものであり、発酵生理学、応用微生物学、分子微生物科学、細胞生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月7日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）